

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860180

研究課題名(和文) エピゲノム制御を支える核内解毒機構の実態解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms for nuclear redox maintenance system to support epigenome regulation

研究代表者

北村 大志 (Kitamura, Hiroshi)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20706949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エピゲノム制御機構を支える核内の解毒機構の実態解明を行った。遺伝子欠損細胞やマウスを用いた実験から、FDHとNRF2がグルタチオンを介して協調的に作用することで、レドックスバランスを調整していることが明らかになった。また、このNRF2-FDH-GSHシステムの生体における意義を検証したところ、肝臓の酸化ストレス時に機能していると考えられた。また、がん細胞でNRF2-GSH-FDHシステムが増強していると考えられる細胞を樹立することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed molecular mechanisms of maintenance system for nuclear redox balance to support the epigenome regulation. Using gene-deleted cells and gene-knockout mice, we successfully showed that NRF2 and FDH cooperatively function through the regulation of GSH in the protection from oxidative damage in liver. We also found that formaldehyde increased in the Nrf2::Fdh double mutant cells, compared to respective single mutant cells. To examine the importance of NRF2-FDH-GSH system in cancer cells, we successfully established a model cancer cell line, which rigorously form tumors in allograft experiments in NRF2-dependent manner.

研究分野：分子生物学

キーワード：NRF2 FDH グルタチオン ヒストン脱メチル化 ホルムアルデヒド

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム制御の一端を担うヒストンや DNA の脱メチル化反応は、遊離のホルムアルデヒドを産生することが分かっている。ホルムアルデヒドは、反応性の高い親電子性物質であり、脱メチル化反応の直後に、クロスリンク傷害を起こし DNA ダメージを与えるほか、エピゲノムをしかし、脱メチル化反応は核内で高頻度におこっているにも関わらず、クロスリンク傷害は通常ほとんど検出されないことから、核内において何らかの解毒機構があると予想される。現在までに、核内でおこる脱メチル化に伴うアルデヒド類の解毒機構に関する報告はほとんどなく、その生体における意義も不明な点が多い。

2. 研究の目的

核内では、ヒストン脱メチル化反応やシトシンの非酵素的メチル化に対する脱メチル化反応の結果、反応性の高い新電子性物質であるホルムアルデヒドが発生する。本研究では、未だに不明な点が多い核内のエピゲノム反応時に発生するホルムアルデヒドの解毒代謝に、酸化ストレス応答の重要な役割を担っている転写因子 NRF2 が、グルタチオン (GSH) の産生促進を通して、ホルムアルデヒド脱水素酵素 FDH と協調することで (NRF2-GSH-FDH システム)、核内のレドックス恒常性を維持しているという仮説を検証する(図 1)。そして、核内脱メチル化反応と NRF2-GSH-FDH システムの機能的連携の生体での意義を、細胞の初期化におけるリプログラミングやがん細胞の悪性化機構に着目して解析する。

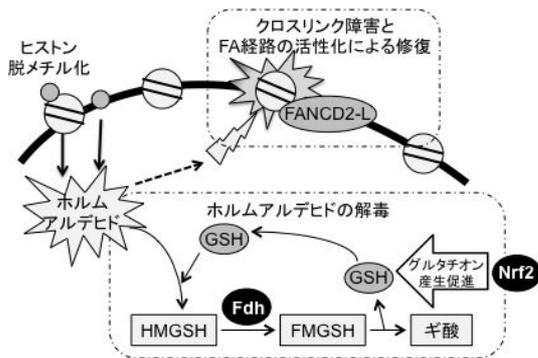


図1 核内における脱メチル化反応とホルムアルデヒド解毒の機能関連モデル

3. 研究の方法

(1) 核内脱メチル化反応と NRF2-GSH-FDH システムの機能的連携の証明

Nrf2 欠損マウス、*Fdh* 欠損マウスおよび

Nrf2::Fdh 二重欠損マウスを用いて、核内における解毒機構に機能欠損が生じると考えられる遺伝子欠損繊維芽細胞(Mouse Embryonic Fibroblast, MEF)を作製し、細胞内ホルムアルデヒド量やグルタチオンの合成量を定量する。またヒストン脱メチル化活性の変化を検証する。NRF2-GSH-FDH システムの存在をがん細胞で検証するために、ヒストン脱メチル化に依存して増殖をするがん細胞で *Nrf2* 欠損、*Fdh* 欠損、*Nrf2::Fdh2* 二重欠損細胞を遺伝子改変技術 CRISPR/CAS9 システムにより作製する。これらの作製が難航する場合はそれぞれの遺伝子欠損 MEF を取得し、RAS の活性化型変異体を導入して、NRF2-GSH-FDH システムの機能が向上していると考えられるモデルがん細胞を作製する。

(2) 核内脱メチル化反応と NRF2-GSH-FDH システムの機能的連携の生体内における意義の検討

Nrf2 欠損マウス、*Fdh* 欠損マウスおよび *Nrf2::Fdh* 二重欠損マウスを用いて、NRF2-GSH-FDH システムの機能的連携の意義を明らかにする。着目する臓器としては、NRF2 が重要な機能を持っている肝臓を選択する。また、前項(1)で作成する遺伝子欠損細胞をヌードマウスに移植して、がん細胞の増殖におけるその貢献を調べる。

4. 研究成果

(1) 核内脱メチル化反応と NRF2-GSH-FDH システムの機能的連携の証明

GSH を介した NRF2 と FDH の協調作用を検証するため、*Fdh* 単独欠損 MEF および *Nrf2::Fdh* 二重欠損 MEF を樹立した。*Nrf2::Fdh* 二重欠損 MEF では GSH 量やその半減期が *Fdh* 単独欠損 MEF より減少していたことから、GSH の維持に両者が協調的に機能していることが示された。またこの時に、ホルムアルデヒドは二重欠損細胞で最も増加していた。*Fdh* の単独欠損 MEF に NRF2 の活性化剤を添加させ、酸化ストレスをかけると *Fdh* 欠損 MEF の脆弱性が回復したことから、*Fdh* 欠損状態において NRF2 の活性化による代償機構があると示唆された。*Fdh* 欠損がヒストン脱メチル化に与える影響を考慮するため、*Fdh* 欠損細胞にヒストン脱メチル化酵素 LSD1 を高発現させ、その活性を野生型 MEF で発現させた場合と比較したが、大きな変化は観察されなかった。

ヒストン脱メチル化酵素の機能に依存し

て増殖するがん細胞を用いた遺伝子改変があまり効率的ではなかったことから、MEFに活性化型 RAS 変異体を発現させてトランスフォームしたがん細胞(RAS MEF)を作成した。野生型および *Keap1* 欠損(NRF2 が恒常的に活性化状態にある)マウスの MEF を用いて、野生型 RAS MEF と *Keap1* 欠損 RAS MEF を樹立した。ヌードマウスへの移植では、*Keap1* 欠損 RAS MEF の腫瘍形成性能が大幅に上昇していた。この表現型が *Keap1* 遺伝子の欠損、すなわち、NRF2 機能増強に依存していることを確認した。以上から、*Keap1* 欠損 RAS MEF は NRF2 に依存した腫瘍形成性能をもつ細胞であると判断した。

2) 核内脱メチル化反応と NRF2-GSH-FDH システムの機能的連携の生体内における意義の検討

MEF 細胞を用いた実験から見いだされた NRF2 による *Fdh* 欠損の代償機構をマウス個体でも証明するため、*Fdh* 欠損状態において NRF2 が活性化している *Fdh::Keap1* 二重欠損マウスを作製した。これらまでの研究から *Fdh* 欠損マウスでは、メチオニンコリン欠乏食がもたらす酸化ストレスによる肝障害の重症化が認められている。しかし、*Fdh::Keap1* 二重欠損マウスでは MCD 食がもたらす肝障害がほとんど認められず、酸化ストレス負荷に対して抵抗性を獲得していることが分かった。なお、この実験において *Fdh::Nrf2* 二重欠損マウスは最も重篤な症状を示した。以上より、細胞および個体レベルで FDH と NRF2 が協調して酸化ストレスからの防御機構に貢献することが明らかになった。

近年、クロマチンを基盤としたエピゲノム制御は、細胞内代謝産物によって制御されることが明らかになっている。しかし、核内で発生する代謝産物がエピゲノムに与える影響について考慮した報告は国内外を含め、少なく、解析が進んでいない。本研究はそのような点に着目している点に特色がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- (1) *Kitamura H, *Matsumori H, Kalendova A, Hozak P, Goldberg IG, Nakao M, Saitoh N, Harata M.
(*equal contribution)
“The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus.”
Biochem Biophys Res Commun,
査読あり

2015 年, volume 464, page 554-560,

DOI::10.106/j.bbrc

- (2) Goto M, Kitamura H, Alam MM, Ota N, Haseba T, Akimoto T, Shimizu A, Takano-Yamamoto T, Yamamoto M, and Motohashi H.

“Alcohol dehydrogenase 3 contributes to the protection of liver from nonalcoholic steatohepatitis.”

Genes Cells,

査読あり

2015 年 volume 20, page 464-480

DOI::10.1111/gtc.12237

- (3) Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, Murakami S, Dodo M, Kitamura H, Taguchi K, Shibata T, Watanabe M, Suzuki H, Shibahara I, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Yamamoto M, Motohashi H, and Tominaga T.

“Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients.”

Neuro-Oncology,

査読あり

2014 年, volume 17, page 555-565

DOI::10.1093/neruonc/nou282.

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計8件)

- (1) 北村大志、本橋ほづみ .
「*KEAP1* 遺伝子変異は RAS シグナルと協調して腫瘍形成を促進する」
第 38 回日本分子生物学会年会 / 第 88 回日本生化学会大会合同大会 .
2015 年 12 月 1 日-4 日
神戸ポートアイランド . 神戸 .
- (2) 金森政之、比嘉剛志、園田順彦、村上昌平、北村大志、百々美奈、柴田龍弘、渡辺みか、鈴木博義、柴原一陽、齋藤竜太、山下洋二、隈部俊宏、山本雅之、本橋ほづみ、富永悌二 .
「悪性神経膠腫における NRF2 経路活性化と予後に関する検討」
第 16 回日本分子脳神経外科学会
2015 年 8 月 28 日-29 日
アクトシティ浜松コンgresセンター
浜松
- (3) 後藤まき、北村大志、Md. Morshedul Alam、長谷場健、山本照子、山本雅之、笠松真吾、井田智章、赤池孝章、本橋ほづみ .
「グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素 ADH3 による酸化ストレス防御と代謝制御」
Research PlaNet 2015
2015 年 6 月 20 日-21 日

梅田スカイビルタワー・ウェスト 大阪

- (4) Md. Morshedul Alam、後藤まき、北村大志、井田智章、赤池孝章、本橋ほづみ。
「Human ADH5 polymorphism affect susceptibility to electrophilic stresses」
日本生化学会東北支部第81回例会。
2015年5月9日
東北大学片平さくらホール。仙台
- (5) 後藤まき、北村大志、長谷場健、秋元敏雄、山本照子、山本雅之、本橋ほづみ
「Alcohol dehydrogenase 3 Cooperates with Keap1-Nrf2 system for protection of Mouse Liver from Nonalcoholic steatohepatitis」
がんエピゲノム研究会 冬の合宿
2015年2月14—15日
秋保 リゾートホテルクレセント 仙台
- (6) 後藤まき、北村大志、澤智裕、赤池孝章、長谷場健、秋元敏雄、山本(高野)照子、山本雅之、本橋ほづみ
「生体防御における転写因子 Nrf2 とグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素 Adh3 による協調作用」
第87回日本生化学会大会
2014年10月15日—18日
京都 国立京都国際会館
- (7) 後藤まき、北村大志、澤智裕、赤池孝章、長谷場健、秋元敏雄、山本照子、山本雅之、本橋ほづみ
「転写因子 Nrf2 とグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素 Adh3 による協調的生体防御機構」
生命素子による転写環境とエネルギー代謝のクロストーク制御 転写代謝システム-平成26年度領域班会議-
2014年7月11日~7月13日
岩沼旅館 仙台 秋保温泉
- (8) 北村大志、百々美奈、比嘉剛志、金森政之、本橋ほづみ
「IDH1 遺伝子変異がもたらす NRF2 機能への影響」
生命素子による転写環境とエネルギー代謝のクロストーク制御 転写代謝システム-平成26年度領域班会議-
2014年7月11日~7月13日
岩沼旅館 仙台 秋保温泉

〔図書〕(計1件)

1. 北村大志、本橋ほづみ
「Keap1-Nrf2 経路の遺伝子変異と

がん代謝」
実験医学(羊土社), 32 巻, 1955-1960.
2014 年

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/ger/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
東北大学・加齢医学研究所
遺伝子発現制御分野・助教
北村 大志 (KITAMURA Hiroshi)
研究者番号: 20706949

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし